

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003528

International filing date: 30 December 2004 (30.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: PCT/KR03/002899  
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 25 January 2005 (25.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출 원 번 호 : PCT/KR2003/002899  
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 30일  
Date of Application DEC 30, 2003

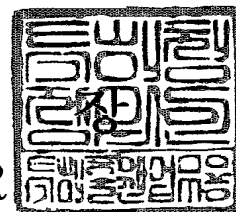
출 원 인 : SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION  
Applicant(s)



2004 년 12 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER



REQUEST

1/9

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:06:32 PM

GP030054

6-1-2003-0018202-94



PCT/KR03/02899

2003.12.30

수리관청 (우만중)

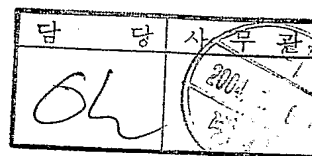
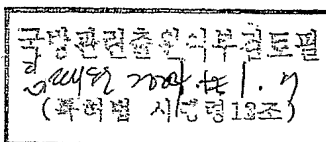
PCT/KR 03 / 02899

30 DECEMBER 2003 (30.12.03)

PCT

Korean Intellectual Property Office  
PCT International Application

0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.11.2003)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Korean Intellectual Property Office (RO/KR)
0-7	Applicant's or agent's file reference	GP030054
I	Title of invention	EMBRYONIC STEM CELL LINE FROM EMBRYO TRANSFERRED BY SOMATIC CELL NUCLEUS AND NEURAL CELLS DIFFERENTIATED THEREFROM
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION
II-5	Address:	San 4-2, Bongcheon-dong, Gwanak-gu, 151-050 Seoul Republic of Korea
II-6	State of nationality	KR
II-7	State of residence	KR
II-8	Telephone No.	82-2-880-7890
II-9	Facsimile No.	82-2-872-1813
II-10	e-mail	snuif@snu.ac.kr



REQUEST

GP030054

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:09:05 PM

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	all designated States
III-1-4	Name (LAST, First)	ROH, Sung-Il
III-1-5	Address:	# 79-1301, Hyundai Apt., 458, Apgujeong 2-dong, Gangnam-gu, 135-905 Seoul Republic of Korea
III-1-6	State of nationality	KR
III-1-7	State of residence	KR
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	HWANG, Woo-Suk
III-2-5	Address:	#106-701, Nonhyeon Apt., 22, Nonhyeon-dong, Gangnam-gu, 135-820 Seoul Republic of Korea
III-2-6	State of nationality	KR
III-2-7	State of residence	KR
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	LEE, Byeong-Chun
III-3-5	Address:	#207-203, Dusan Apt., 1708-1, Bongcheon-dong, Gwanak-gu, 151-050 Seoul Republic of Korea
III-3-6	State of nationality	KR
III-3-7	State of residence	KR
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	KANG, Sung-Keun
III-4-5	Address:	#936-807, Faculty Apt., Seoul National University, Bongcheon 7-dong, Gwanak-gu, 151-742 Seoul Republic of Korea
III-4-6	State of nationality	KR
III-4-7	State of residence	KR

III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is:	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	RYU, Young-June
III-5-5	Address:	#404, Sun-Jeong, #196-3, Bongcheon 11-dong, Gwanak-gu, 151-817 Seoul Republic of Korea
III-5-6	State of nationality	KR
III-5-7	State of residence	KR
III-6	Applicant and/or inventor	
III-6-1	This person is:	applicant and inventor
III-6-2	Applicant for	US only
III-6-4	Name (LAST, First)	LEE, Eu-Gene
III-6-5	Address:	#404, Sun-Jeong, #196-3, Bongcheon 11-dong, Gwanak-gu, 151-817 Seoul Republic of Korea
III-6-6	State of nationality	KR
III-6-7	State of residence	KR
III-7	Applicant and/or inventor	
III-7-1	This person is:	applicant and inventor
III-7-2	Applicant for	US only
III-7-4	Name (LAST, First)	KIM, Soon-Woong
III-7-5	Address:	#101-811, Hyundai-Sungwoo Apt., Silimbon-dong, Gwanak-gu, 151-799 Seoul Republic of Korea
III-7-6	State of nationality	KR
III-7-7	State of residence	KR
III-8	Applicant and/or inventor	
III-8-1	This person is:	applicant and inventor
III-8-2	Applicant for	US only
III-8-4	Name (LAST, First)	KWON, Dae-Kee
III-8-5	Address:	#317-4, Dapsimni 5-dong, Dongdaemun-gu, 130-803 Seoul Republic of Korea
III-8-6	State of nationality	KR
III-8-7	State of residence	KR

REQUEST

GP030054

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:09:05 PM

III-9	Applicant and/or inventor	
III-9-1	This person is:	applicant and inventor
III-9-2	Applicant for	US only
III-9-4	Name (LAST, First)	KWON, Hee-Sun
III-9-5	Address:	#935-502, Dormitory, Seoul National University, San 4-1, Bongcheon 7-dong, Gwanak-gu, 151-050 Seoul Republic of Korea
III-9-6	State of nationality	KR
III-9-7	State of residence	KR
III-10	Applicant and/or inventor	
III-10-1	This person is:	applicant and inventor
III-10-2	Applicant for	US only
III-10-4	Name (LAST, First)	KOO, Ja-Min
III-10-5	Address:	#330-503, 3rd complex Apt., Mok 5-dong, Yangcheon-gu, 151-050 Seoul Republic of Korea
III-10-6	State of nationality	KR
III-10-7	State of residence	KR
III-11	Applicant and/or inventor	
III-11-1	This person is:	applicant and inventor
III-11-2	Applicant for	US only
III-11-4	Name (LAST, First)	PARK, Eul-Soon
III-11-5	Address:	#202-906, Hanyang Apt., Taesaeng-ri, Daeso-myeon, Eumseong-gun, 369-824 Chuncheongbuk-do Republic of Korea
III-11-6	State of nationality	KR
III-11-7	State of residence	KR
III-12	Applicant and/or inventor	
III-12-1	This person is:	applicant and inventor
III-12-2	Applicant for	US only
III-12-4	Name (LAST, First)	HWANG, Youn-Young
III-12-5	Address:	#108-1604, Park-Town, Sunae-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, 463-020 Gyeonggi-do Republic of Korea
III-12-6	State of nationality	KR
III-12-7	State of residence	KR

EQUEST

GP030054

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:09:05 PM

III-13	Applicant and/or inventor	
III-13-1	This person is:	applicant and inventor
III-13-2	Applicant for	US only
III-13-4	Name (LAST, First)	MOON, Shin-Yong
III-13-5	Address:	#21-205, Sampung Apt., 1685, Seocho-dong, Seocho-gu, 137-882 Seoul Republic of Korea
III-13-6	State of nationality	KR
III-13-7	State of residence	KR
III-14	Applicant and/or inventor	
III-14-1	This person is:	applicant and inventor
III-14-2	Applicant for	US only
III-14-4	Name (LAST, First)	OH, Sun-Kyung
III-14-5	Address:	#408-1401, Samwhan Apt., Bangwaha 3-dong, Gangseo-gu, 157-223 Seoul Republic of Korea
III-14-6	State of nationality	KR
III-14-7	State of residence	KR
III-15	Applicant and/or inventor	
III-15-1	This person is:	applicant and inventor
III-15-2	Applicant for	US only
III-15-4	Name (LAST, First)	AHN, Cu-Rie
III-15-5	Address:	#201-708, Anam Apt., 236, Myeongnyun-dong 2-ga, Jongno-gu, 110-767 Seoul Republic of Korea
III-15-6	State of nationality	KR
III-15-7	State of residence	KR
III-16	Applicant and/or inventor	
III-16-1	This person is:	applicant and inventor
III-16-2	Applicant for	US only
III-16-4	Name (LAST, First)	YOON, Hyun-Soo
III-16-5	Address:	#101-505, Maebong Apt., 966, Dogok-dong, Gangnam-gu, 135-504 Seoul Republic of Korea
III-16-6	State of nationality	KR
III-16-7	State of residence	KR

III-17	Applicant and/or inventor	
III-17-1	This person is:	applicant and inventor
III-17-2	Applicant for	US only
III-17-4	Name (LAST, First)	PARK, Jong-Hyuk
III-17-5	Address:	#104-204, Donga-1cha Apt., Yeomchaŋg-dong, Gangseo-gu, 157-040 Seoul Republic of Korea
III-17-6	State of nationality	KR
III-17-7	State of residence	KR
III-18	Applicant and/or inventor	
III-18-1	This person is:	applicant and inventor
III-18-2	Applicant for	US only
III-18-4	Name (LAST, First)	KIM, Sun-Jong
III-18-5	Address:	#304-1102, Sinsung-Eunhasoo Apt., Buheung-dong, Dongan-gu, Anyang-si, 431-054 Gyeonggi-do Republic of Korea
III-18-6	State of nationality	KR
III-18-7	State of residence	KR
III-19	Applicant and/or inventor	
III-19-1	This person is:	applicant and inventor
III-19-2	Applicant for	US only
III-19-4	Name (LAST, First)	CHOI, Yang-Kyu
III-19-5	Address:	#129-1307, Hanbit Apt., 99, Eoeun-dong, Yuseong-gu, 305-806 Daejeon Republic of Korea
III-19-6	State of nationality	KR
III-19-7	State of residence	KR
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Sei-Jin
IV-1-2	Address:	17th Floor, City Air Tower, 159-9 Samsung-dong, Gangnam-gu, 135-973 Seoul Republic of Korea
IV-1-3	Telephone No.	82-2-6203-1020
IV-1-4	Facsimile No.	82-2-6203-1026
IV-1-5	e-mail	sjlee@hanolip.com
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	KIM, Seong-Nam



V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AP: BW GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT</p> <p>EP: AT BE BG CH&amp;LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT</p>
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH&amp;LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR <u>KZ</u> LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG <u>US</u> UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>
V-5	Precautionary Designation Statement  In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI	Priority claim	NONE
VII-1	International Searching Authority Chosen	Korean Intellectual Property Office (KIPO) (ISA/KR)

REQUEST

GP030054

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:09:05 PM

VIII	<b>Declarations</b>	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	<b>Check list</b>	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	9	-
IX-2	Description	36	-
IX-3	Claims	5	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	11	-
IX-7	TOTAL	62	
	<b>Accompanying items</b>	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. GP030054	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	Korean	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Sei-Jin	
X-2	Signature of applicant, agent or common representative		
X-2-1	Name (LAST, First)	KIM, Seong-Nam	

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	30 DECEMBER 2003 (30.12.03)
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	

REQUEST

GP030054

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:09:05 PM

10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/KR
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	----------------------------------------------------------------	--

# ANNEX - FEE CALCULATION SHEET

1/2

GP030054

Original (for SUBMISSION) - printed on 30.12.2003 02:09:05 PM

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only		
0-1	International Application No.	<b>PCT/KR 03 / 02899</b>	
0-2	Date stamp of the receiving Office	30.12.2003	
0-4	Form - PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet		
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.11.2003)	
0-9	Applicant's or agent's file reference	GP030054	
2	Applicant	SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, et al.	
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (KRW)
12-1	Transmittal fee T	⇒	45,000
12-2-1	Search fee S	⇒	150,000
12-2-2	International search to be carried out by	KR	
12-3	International fee		
	Basic fee		
	(first 30 sheets) b1	530,000	
12-4	Remaining sheets	32	
12-5	Additional amount (X)	12,000	
12-6	Total additional amount b2	384,000	
12-7	b1 + b2 = B	914,000	
12-8	Designation fees		
	Number of designations contained in international application	99	
12-9	Number of designation fees payable (maximum 5)	5	
12-10	Amount of designation fee (X)	114,000	
12-11	Total designation fees D	570,000	
12-12	PCT-EASY fee reduction R	-163,000	
12-13	Total International fee (B+D-R) I	⇒	1,321,000
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒	1,516,000
12-19	Mode of payment	cash	

## VALIDATION LOG AND REMARKS

13-2-1	Validation messages Request	Green? A translation of the international application into English will have to be prepared under the responsibility of the ISA selected.
--------	--------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## General Power of Attorney

Agent:

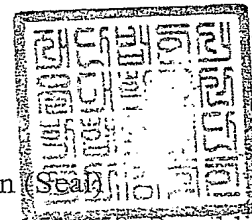
Name: Lee, Sei Jin ; Kim, Seong Nam  
Address: 17<sup>th</sup> Floor, City Air Tower  
159-9 Samsung-dong, Gangnam-gu  
Seoul 135-973, Republic of Korea

I/We, the undersigned, do hereby appoint the above-identified agents as my/our agents to act for me/us in all proceedings concerning with any and all of the following International Applications.

Date: December 2, 2003

Applicants:

Name: Seoul National University Industry Foundation (Seal)  
Address: San 4-2, Bongcheon-dong, Gwanak-gu, Seoul, 151-050, Republic of Korea



## General Power of Attorney

Agent:

Name: Lee, Sei Jin ; Kim, Seong Nam  
Address: 17<sup>th</sup> Floor, City Air Tower  
159-9 Samsung-dong, Gangnam-gu  
Seoul 135-973, Republic of Korea

I/We, the undersigned, do hereby appoint the above-identified agents as my/our agents to act for me/us in all proceedings concerning with any and all of the following International Applications.

Date: December 3, 2003

Applicants:

Name: ROH, Sung-II (Seal)  
Address: # 79-1301, Hyundai Apt. 458, Apgujeong 2-dong, Gangnam-gu  
Seoul, 135-905, Republic of Korea

Name: HWANG, Woo-Suk (Seal)  
Address: #106-701, Nonhyeon Apt. 22, Nonhyeon-dong, Gangnam-gu,  
Seoul, 135-820, Republic of Korea

Name: LEE, Byeong-Chun (Seal)  
Address: #207-203, Dusan Apt. 1708-1, Bongcheon-dong, Gwanak-gu,  
Seoul, 151-050, Republic of Korea

Name: KANG, Sung-Keun (Seal)  
Address: #936-807, Faculty Apt. Seoul National University, Bongcheon 7-dong,  
Gwanak-gu, Seoul, 151-742, Republic of Korea

Name: RYU, Young-June (Seal)  
Address: #404, Sun-Jeong, #196-3, Bongcheon 11-dong, Gwanak-gu,  
Seoul, 151-817, Republic of Korea

Name: LEE, Eu-Gene

(Seal)

Address: #404, Sun-Jeong, #196-3, Bongcheon 11-dong, Gwanak-gu,  
Seoul, 151-817, Republic of Korea

Name: KIM, Soon-Woong

(Seal)

Address: #101-811, Hyundae-Sungwoo Apt. Silimbon-dong, Gwanak-gu,  
Seoul, 151-799, Republic of Korea

Name: KWON, Dae-Kee

(Seal)

Address: #317-4, Dapsimni 5-dong, Dongdaemun-gu,  
Seoul, 130-803, Republic of Korea

Name: KWON, Hee-Sun

(Seal)

Address: #935-502, Dormitory, Seoul National University, San 4-1,  
Bongcheon 7-dong, Gwanak-gu, Seoul, 151-050, Republic of Korea

Name: KOO, Ja-Min

(Seal)

Address: #330-503, 3th complex Apt. Mok 5-dong, Yangcheon-gu,  
Seoul, 151-050, Republic of Korea

Name: PARK, Eul-Soon

(Seal)

Address: #202-906, Hanyang Apt. Taesaeng-ri, Daeso-myeon,  
Eumseong-gun, Chuncheongbuk-do, 369-824, Republic of Korea

Name: HWANG, Youn-Young

(Seal)

Address: #108-1604, Park-Town, Sunae-dong, Bundang-gu, Seongnam-si,  
Gyeonggi-do, 463-020, Republic of Korea

Name: MOON, Shin-Yong

(Seal)

Address: #21-205, Sampung Apt. 1685, Seocho-dong, Seocho-gu,  
Seoul, 137-882, Republic of Korea

Name: OH, Sun-Kyung

(Seal)

Address: #408-1401, Samwhan Apt. Bangwha 3-dong, Gangseo-gu,  
Seoul, 157-223, Republic of Korea

Name: AHN, Cu-Rie



Address: #201-708, Anam Apt. 236, Myeongnyun-dong 2-ga, Jongno-gu,  
Seoul, 110-767, Republic of Korea

Name: YOON, Hyun-Soo



Address: #101-505, Maebong Apt. 966, Dogok-dong, Gangnam-gu,  
Seoul, 135-504, Republic of Korea

Name: PARK, Jong-Hyuk



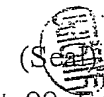
Address: #104-204, Donga-1cha Apt. Yeomchang-dong, Gangseo-gu,  
Seoul, 157-040, Republic of Korea

Name: KIM, Sun-Jong



Address: #304-1102, Sinsung-Eunhasoo Apt. Buheung-dong, Dongan-gu,  
Anyang-si, Gyeonggi-do, 431-054, Republic of Korea

Name: CHOI, Yang-Kyu



Address: #129-1307, Hanbit Apt. 99, Eoeun-dong, Yuseong-gu,  
Daejeon, 305-806, Republic of Korea



자가 체세포 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주 및  
이로부터 분화된 신경 세포

{EMBRYONIC STEM CELL LINE FROM EMBRYO TRANSFERRED by  
SOMATIC CELL NUCLEUS and NEURAL CELLS DIFFERENTIATED THEREFROM}

5

### 기술분야

본 발명은 자가 체세포 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주 및  
이로부터 분화된 신경 세포에 관한 것으로, 보다 자세하게는 사람 또는 동물의  
10 체세포 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 형성된 핵 이식란을 배반포까지 배양하고,  
상기 배반포로부터 분리한 내세포괴(Inner Cell Mass, ICMs)를 배양하여  
수득한 배아 줄기 세포주 및 이로부터 분화된 신경 세포에 관한 것이다.

### 배경기술

15

일반적으로, 줄기 세포(stem cell)는 인체를 구성하는 모든 종류의  
성숙한 기능성 세포로 발생할 수 있는 미분화 세포를 말한다. 예를 들면,  
조혈모세포(hematopoietic stem cell)는 최종적으로 분화된 여러 타입의 혈구  
세포들 중 어느 하나로 발생할 수 있다. 배아 간(embryonic stem, ES)세포는  
20 배아로부터 유래된 다능성(pluripotent) 세포이므로 인체를 구성하는 모든  
종류의 기관, 조직, 세포로 분화, 발달할 수 있는 능력을 가지고 있다.

1981년에 마우스 ES 세포주의 수립은 사람 ES 세포의 발달을 위한  
상당한 기술 및 범례(paradigm)를 제공하였다. ES 세포의 발달은 마우스의  
기형암종(teratocarcinoma, 일부 동종번식된 계통(strain)의 생식선에서

발생하는 증양)에 대한 연구로부터 전개되었다(Evans and Kaufman et al., Nature, 1981).

Bongso 등은 생체 외에서 수정된 사람 배아로부터 나온 세포의 단기간 배양 및 유지 방법에 대하여 보고하였다(Bongso et al. Human reproduction, 5 1994). Bongso 등에 의해서 분리된 세포들은 다능성 줄기 세포에서 예상된 형태(morphology)를 가지고 있었지만, 이러한 초기 연구는 적절한 영양 세포층(feeder cell support)을 이용하지 못했기 때문에 장기간 배양하는 것은 불가능하였다.

붉은 털 원숭이(rhesus monkey)의 배반포 및 비단 원숭이(marmoset 10 monkey)의 배반포로부터 영장류의 ES 세포 제조가 보고되었다. 이러한 영장류의 세포주는 이배체(diploid)이지만, 이들의 가장 가까운 상대자인 사람의 ES 세포와 매우 유사하였다. 원숭이 및 사람의 ES 세포에 대한 연구로부터 이들의 ES 세포는 마우스 ES 세포와 표현형에서 다소 상이하지만, 다능성 줄기 세포가 사람의 배반포로부터 유래될 수 있다는 것을 15 시사하였다(Thomson et al., PNAS, 95, 7844, 1995).

1998년 Thomson 등에 의해서 개발된 다능성 인간 줄기 세포주의 특성은 다음과 같다:

(1) SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60, GCTM-2, 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), Oct-4를 발현함;

20 (2) 구별되는 세포 경계선을 가지며 편평한 콜로니로 성장함;

(3) 3 배엽 세포들로 분화함;

(4) 영양 세포에 의존함;

(5) 단일 세포로의 분리에 매우 민감하고 영양 세포층 상에서도 낮은 클로닝 효율을 나타냄; 및

(6) 백혈병 억제 인자에 반응하지 않음.

Thomson 등은 불임 치료 중인 커플로부터 기증받은 잉여 배반포로부터 ES 세포를 수득하였다. 이 과정에서 사용된 방법은 마우스 ES 줄기 세포를  
 5 획득하기 위해서 17년 전에 사용된 방법과 크게 다르지 않았다: ES 세포 확립을 억제하는 것으로 예상되었던 영양외배엽(trophectoderm)을 면역수술(immunosurgery)적 방법으로 제거하였고, 내세포괴(inner cell mass)를 마우스의 배아에서 유래된 섬유아 영양 세포층에 배치(plating)하고, 짧은 부착 및 확장 기간 후, 또 다른 영양 세포 층상에 재배치하였다. 마우스  
 10 ES 프로토콜과는 배지 또는 배양 시스템에서 커다란 차이는 없었지만 상대적으로 높은 성공률이 달성되었다.

이러한 배아 줄기 세포는 앞서 주지된 바와 같이 다양한 세포 타입으로 분화할 수 있는 잠재적으로 무제한적인 세포원으로, 당뇨병 및 파킨슨 질병과 같은 질환들을 치료하는데 이용될 수 있다. 그러나 공여자와 수여자간의 조직  
 15 면역 거부반응으로 인하여 배아 줄기 세포를 치료학적 용도로 이용하는데 한계가 있었다.

이러한 공여자와 수여자간의 조직 면역 거부 반응 문제를 극복하기 위해서는 특정 조직으로 분화될 배아 줄기 세포의 유전 형질이 수여자의 유전 형질과 동일한 것이 최적일 것이며, 이를 위해서는 줄기 세포를 수득할 수  
 20 있는 배아에 수여자의 핵을 이식하는 것을 고려할 수 있다. 하지만, 최근의 논문 (Shattern et al., Science, 2003)에서는 사람을 포함한 영장류에서는 핵 이식에 의한 배아의 작제가 불가능하다고 밝힌 바 있다.

발명의 요약

하지만, 본 발명자들은 공여자와 수여자간의 조직 면역 거부 반응을 회피할 수 있는 자가 유래의 체세포 핵이 도입된 핵 이식란 작제 및 이의  
 5 활성화와 배반포까지의 배양 조건을 설정하고, 더 나아가 자가 체세포 핵 이식된 배반포의 내세포괴에서 분리한 세포를 배아 줄기 세포주로 제조하는 방법을 수립하였으며 또한, 이 줄기 세포로부터 신경 세포로의 분화에 성공하고 본 발명에 이르게 되었다.

10 본 발명은 한 관점으로서, 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 개체의 체세포 핵을 탈핵된 난자로 이식하여 형성된 자가 핵이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포를 제공한다.

본 발명은 다른 관점으로서,

(1) 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 개체의  
 15 체세포를 배양한 세포주를 공여핵 세포로 준비하는 단계;

(2) 수핵 난자의 1 극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함한 수핵 난자를 준비하는 단계;

(3) 상기 단계 (1)에서 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시키는 과정을 포함하는 핵 이식란을 작제하는 단계;

20 (4) 핵 이식란을 리프로그래밍 시간을 거친 다음 활성화시키고 배반포까지 생체 외 배양하는 과정을 포함하는 배반포를 작제하는 단계 및

(5) 상기 배반포에서 ICMs(Inner Cell Mass)를 분리하고 이를 미분화상태가 유지되도록 배양하여 배아 줄기 세포주를 확립하는 단계를 포함하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 또 다른 관점으로서, 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받은 개체의 체세포에서 유래된 핵을 난자로 이식하여 형성된 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포를 제공한다.

본 발명은 또 다른 관점으로서,

5 (1) 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주를 배양하여 배아체를(embryonic body)를 형성하는 단계;

(2) 화학물질(chemical)을 첨가하여 배양하는 단계 및

(3) 신경 세포의 마커를 발현하는 세포를 선별하는 단계를 포함하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포의  
10 제조방법을 제공한다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에서 수득한 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기  
15 세포의 미분화 콜로니의 사진이다(A;x100, B;x200).

도 2는 본 발명에서 수득한 미분화 콜로니에 ITSF(즉, 인슐린, 트랜스페린, 소듐 셀레네이트 및 피브로넥틴)를 첨가하여 분화된 신경 세포의 형광염색 사진이다(x400).

도 3은 본 발명에서 사용되는 고정용 피펫(1)과 절개용 피펫(2)으로  
20 수핵난자(3)의 투명대를 절개하는 과정을 나타낸 사진이다.

도 4는 탈핵 과정으로 고정용 피펫과 절개용 피펫으로 수핵난자의 제 1극체와 핵을 제거하는 과정을 나타낸 사진이다.

도 5는 본 발명에서 사용되는 고정용 피펫과 이식용 피펫(4)으로 탈핵된 난자에 체세포를 이식하는 과정을 나타낸 사진이다.

도 6A 내지 6D는 본 발명에 따른 배아 줄기 세포주에 핵을 제공한 환자의 체세포 핵형 분석 결과 및 본 발명에 따라 수득한 배아 줄기 세포주의 핵형 분석 결과를 나타낸 사진이다.

도 7은 본 발명에서 수득한 미분화 콜로니를 면역이 결핍된 마우스의  
5 고환에 주사한 후 형성된 테라토마내에서 확인된 3배엽 세포 사진이다(A: 연골, B: 장관, C: 신경관 (A,B,C;x200)).

도8은 본 발명에서 수득한 배아 줄기 세포주의 배아체 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 사진이다(A,B,C-내배엽 D,E,F-중배엽 H,I,J-외배엽:  
A) 알파 페토단백질; B) 사이토케라틴 7; C) HNF; D) BMP-4; E) 미오 D; F)  
10 데스틴(Desmin); G) 뉴로필라멘트(Neurofilament); H) S100; I) NCAM).

### 발명의 상세한 설명

#### 1. 용어의 정의

15

본원 명세서에서 사용된 용어 “핵 이식”은 체세포 (또는 공여핵 세포로 표기함)의 핵을 탈핵된 난자 (또는 수핵 난자로 표기함)에 이식하는 과정을 의미하며, 이러한 과정에 의해서 수득된 세포를 “핵 이식란 또는 재구성된 핵 이식란(reconstructed embryo)” 이라고 한다.

20

본원 명세서에서 사용된 용어 “자가 핵 이식란”이란, 줄기 세포, 이로부터 분화된 특정 세포 또는 조직을 이식받을 개체(individual)의 체세포에서 유래된 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 수득한 핵 이식란을 의미한다.

본원 명세서에서 사용된 용어 “배아 줄기 세포(Embryonic Stem cell, ES)”는 배아(embryo)로부터 유래되어 다양한 세포 타입으로 분화할 수 있는

능력을 가지고 있는 미분화 세포를 말한다. 일반적으로 “배아”는 수정 후 약 8주 까지를 말한다. 이는 수정란의 반복적인 분할(division)로부터 발생하며 일반적으로 배반포 단계[내세포괴(inner cell mass, ICM) 및 외부 영양막 세포(outer trophoctoderm)를 포함]를 포함한다.

5 따라서 본원 명세서에 사용된 용어 “자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주 또는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주 (또는 ntES로 표기함)”는 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 개체의 체세포로부터 유래된 핵을 탈핵된 난자에 이식해서 자가 핵 이식란을 수득하고, 이를 배양하여 수득한 배아에서 분리한 내세포괴로부터 유래된 줄기 세포주를  
10 의미한다.

특히, 본 발명에 따른 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주는 바람직하게는 포유류의 배아 줄기세포주를, 보다 바람직하게는 사람의 배아 줄기 세포주(또는 hntES)를 포함한다.

## 15 2. 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주의 제조방법

본 발명에 따른 “자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주”의 제조방법은

(1) 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 개체의  
20 체세포를 배양한 세포주를 공여핵 세포로 준비하는 단계;

(2) 수핵 난자의 1 극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함한 수핵 난자를 준비하는 단계;

(3) 상기 단계 (1)에서 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시키는 과정을 포함하는 핵 이식란을 작제하는 단계;

(4) 핵 이식란을 리프로그래밍 시간을 거친 다음 활성화시키고 배반포까지 생체 외 배양하는 과정을 포함하는 배반포를 작제하는 단계 및

(5) 상기 배반포에서 ICMs(Inner Cell Mass)를 분리하고 이를 미분화상태가 유지되도록 배양하여 배아 줄기 세포주를 확립하는 단계를 포함하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법을 포함한다.

본 발명에 따른 자가 핵이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (5)의 배반포에서 ICMs를 분리하는 과정은

(1) 배반포로부터 투명대 또는 이의 일부분을 제거하는 단계 및  
10 (2) 영양막 세포를 제거하고 ICMs를 분리하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기에서 수득한 배아 줄기 세포를 추가로 배양하여 증식(proliferation)하는 단계를 포함할 수 있다.

15 이하에서는, 본 발명에 따른 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주의 제조방법을 단계별로 구체적으로 기술하고자 한다.

#### 제 1 단계 : 공여핵 세포의 준비

20 본 발명에서는 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 환자 또는 환축으로부터 수득한 체세포를 배양한 세포주를 공여핵 세포로 준비한다. 이렇게 준비된 세포는 탈핵된 난자에 핵을 공여하게 된다.

살아있는 사람에게서 수득할 수 있는 체세포는 이에 제한되는 것은 아니지만, 피부 세포 또는 난구 세포이다. 이들은 예를 들면, 마더(Marther)



및 바네스(Barnes) 방법(참조 : Marther & Barnes, Methods in Cell Biology, Vol.57, Animal Cell Culture Methods, Academic Press, 1998)을 응용하여 배양함으로써 세포주로 작제할 수 있다.

본 발명에서 상기 배양의 한 양태는 수득한 체세포에 자궁관류액 및 P/S 항생제(페니실린 10000IU, 스트렙토마이신 10mg)가 함유된 인산염 완충 식염수(PBS)를 첨가하고, 원심 분리하여 세척한 다음, 인간 혈청(HS, human serum), 비필수 아미노산(NEAA, non-essential amino acid) 및 P/S 항생제가 첨가된 DMEM에서 39℃에서 5%, CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양하는 것이다.

특히, 난구 세포를 공여핵 세포주로 이용하는 경우, 난구-난모세포 복합체(cumulus-oocyte complex)를 하이알루로니다제로 처리하여 난자를 둘러싸고 있는 난구 세포층을 분리하고, 난구 세포층에 트립신-EDTA 용액을 첨가하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>의 포화습도 배양기 내에 정치시킨 후, 원심 세정하고 상기 조건에서 배양함으로써 작제할 수 있다.

## 15 제 2 단계 : 수핵 난자의 준비

본 발명에서 수핵 난자는 자신(즉, 난자)의 핵을 탈핵하고, 외부로부터 체세포의 핵을 수여받는 난자를 말한다.

본 발명에서는 당업계에 공지된 방법에 따라 사람의 난소에서 과배란 난자를 채취 및 배양하여 성숙한 수핵 난자를 준비할 수 있다. 한 양태로, G 1.2 배지에서 과배란 난자들 중 양호한 상태의 난자를 선별한 후, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에 약 4 시간 동안 배양함으로써 난자를 성숙시킬 수 있다.

다음으로, 상기 성숙한 수핵 난자의 난구 세포(cumulus cell)를 제거한 다음, 수핵 난자의 투명대의 일부를 제거하고 제 1 극체를 포함한 세포질을

제거하여 탈핵된 수핵 난자를 작제할 수 있다.

- 본 발명에서는 한 양태로서 다음과 같이 탈핵이 수행될 수 있다.
- 성숙한 수핵 난자를 하이알루로니다제가 용해된 세정용 배양액에 넣고, 난구 세포를 물리적으로 제거한 후, 세정용 G1.2 배양액으로 세정한다. 그 다음,
- 5 난구 세포가 제거된 난자를 미세작업장치를 이용하여 난자의 투명대를 절개하여 절개창을 형성시킨 후, 이를 통하여 난자의 전체 세포질의 10 내지 15%에 해당하는 양의 제 1 극체를 포함한 세포질을 제거하여 탈핵시킨다. 이어, 탈핵된 난자를 세정용 G1.2 배양액으로 세정하고, 배양용 G1.2 배양액에 정치시킨다.
- 10 탈핵 후, 예를 들면 자외선 하에서 Hoechst 33342(Sigma Co.)로 염색된 세포질체를 관찰함으로써 탈핵 여부를 재확인하는 것이 바람직하다.

### 제 3 단계 : 공여핵 세포와 수핵 난자의 핵 이식 및 전기 융합

- 15 상기 제 1단계에서와 같이 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 수핵 난자에 이식하고, 곧 이어 전기 융합시켜 핵 이식란을 작제한다.

본 발명에서 핵 이식 및 전기 융합은 다음의 양태로 수행될 수 있다.

- 먼저, 상기 단계 (2)에서 수득한 배양용 G1.2 배양액에 정치된 탈핵된 난자를 G1.2 배양액으로 세정하고, 이식용 피펫을 사용하여 공여핵 세포를
- 20 PHA-P 용액에 있는 난자의 투명대에 형성된 절개창으로 주입시켜서 핵 이식란을 작제한다. 이어, 세정용 G1.2 배양액으로 세정하고 정치시킨다.

이어서, 상기 정치된 핵 이식란을 세포 조작기를 이용하여 전기 융합시킨다. 먼저, 핵 이식란을 세정용 G1.2 배양액이 첨가된 만니톨 용액에 넣고, 이를 세포 조작기에 연결시킨 2개 전극 사이에 분주된 만니톨 용액에

넣은 다음, 공여세포가 (+)전극을 향하도록 핵 이식란을 위치시킨다. 그런 다음, 전압은 0.75 내지 2.00kV/cm, 시간은 10 내지 20  $\mu$ s, 횟수는 약 1초 간격으로 1 내지 5회의 조건으로 직류전류를 통전하여 핵 이식란을 전기 융합시킨다.

- 5            마지막으로, 융합된 핵 이식란을 만니톨 용액과 세정용 G1.2 배양액으로 세정한다. 이때 사용하는 만니톨 용액은 HEPES 완충용액에 BSA 및 만니톨이 용해된 pH 7.2 내지 7.4의 용액이다.

#### 제 4단계 : 핵 이식란의 활성화 및 생체 외 배양

10

본 발명에 따른 핵 이식란이 정자와 난자가 합쳐져서 형성된 통상적인 수정란과 같은 발달 과정을 거치기 위해서는 리프로그래밍 시간, 활성화 방법 및 배양 배지를 적합하게 설정해야 한다.

- 본 발명에서는 상기의 재구성 핵 이식란을 활성화시키고 배양함으로써  
15    정상적인 수정 및 발달 과정과 유사한 환경을 제공하고자 한다. 즉, 상기에서 전기 융합시킨 핵 이식란을 리프로그래밍 시간을 거친 다음 활성화시키고 배반포 단계까지 생체 외 배양한다.

- 리프로그래밍 시간은 수핵 난자와 공여핵 세포를 전기 융합시킨 후  
활성화시키기 전까지 핵 이식란을 정지해 놓는 시간을 말하는 것으로, 핵  
20    이식란의 발달 능력(특히, 배반포 형성률)에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명에서 리프로그래밍 시간은 20시간 이하, 바람직하게는 6 시간 이하, 보다 바람직하게는 3 시간 이하, 가장 바람직하게는 약 2시간이다.

상기의 리프로그래밍 시간이 경과한 후 핵 이식란을 활성화시키는데, 본 발명에서 이용 가능한 활성화 방법은 칼슘 이온 운반체(calcium ionophore),

이오노마이신(ionomycin), 에탄올, 타이로드 용액(Tyrode's solution) 및 퓨로마이신(puromycin)과 같은 화학물질(chemical)에 의한 화학적 자극 또는 물리적인 자극 등을 포함한다. 본 발명에서는 리프로그래밍 시간이 경과된 핵 이식란에 칼슘 이온 운반체를 처리하는 활성화 방법이 적합하며, 칼슘 이온 운반체를 처리한 다음 6-DMAP를 처리하는 활성화 방법이 바람직하다. 여기서, 5  
상기 칼슘 이온 운반체의 농도는  $10\ \mu\text{M}$ , 6-DMAP의 농도는  $2.0\text{mM}$ 인 것이 보다 바람직하다.

이때, 6-DMAP는 체외 배양용 배지에 용해시켜 사용한다. 체외 배양용 배지로는 NaCl, KCl,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , Na-락테이트, 포도당, 페놀 레드, 10 BSA, 카나마이신(Kanamycin), 필수 아미노산(EAA, essential amino acid), 비필수 아미노산(NEAA, non-essential amino acid), 글루타민 등을 포함하는 G1.2 배지를 사용하는 것이 바람직하다.

추가로, 핵 이식란의 효율적인 생체 외 배양을 위해서 당업계에 공지된 바와 같이 다양한 에너지 기질(substrate)로 배양 배지를 보충하거나 배아 발달의 단계별로 효과적인 성분들을 함유한 순차적인(sequential) 배양 시스템을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용 가능한 상업적으로 15  
입수할 수 있는 순차적인 배양 시스템에는 예를 들면, G1.2/G2.2 배지가 있다. 바람직한 생체 외 배양 배지에는 본 발명자들에 의해서 확립된 “변형된 mSOFaa 배지”가 포함하는데, 이 배지는 “SNUnt-2 배지”라 명명하였다. 20  
여기서, mSOFaa 배지는 양의 나팔관 유동액에서 확인된 염 및 에너지 대사물의 조성에 착안하여 제조된 공지된 배지로서 소 배아 배양에 광범위하게 이용되고 있다. 본 발명에 따른 SNUnt-2 배지는 mSOFaa 배지의 에너지 물질인 글루코오스를 프룩토오스로 대체하고 사람 혈청 알부민을 첨가함으로써 제조된 것이다.

구체적으로, 상기 “SNUnt-2 배지” 는 (1) 95 내지 110mM NaCl, (2) 7.0 내지 7.5mM KCl, (3) 20 내지 30mM NaHCO<sub>3</sub>, (4) 1.0 내지 1.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (5) 3 내지 8mM Na-락테이트, (6) 1.5 내지 2.0mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, (7) 0.3 내지 0.8mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, (8) 0.2 내지 0.4mM Na-피루베이트, (9) 1.2 내지 1.7mM 프룩토오스, (10) 6 내지 10mg/ml HSA, (11) 0.7 내지 0.8μg/ml 카나마이신, (12) 1.5 내지 3% 필수아미노산, (13) 0.5 내지 1.5% 비필수아미노산, (14) 0.7 내지 1.2mM L-글루타민 및 (15) 0.3 내지 0.7% ITS로 이루어져 있다. 바람직하게 “SNUnt-2 배지” 는 표 1에 정리된 바와 같은 함량의 성분들로 이루어져 있다.

10

&lt;표 1&gt; SNUnt-2 배지

성 분	농 도
NaCl	99.1~106mM
KCl	7.2mM
NaHCO <sub>3</sub>	25mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2mM
Na-락테이트	5mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.7mM
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5mM
Na-피루베이트	0.3mM
프룩토오스	1.5mM
HSA	8mg/ml
카나마이신	0.75μg/ml
필수아미노산	2%
비필수아미노산	1%
L-글루타민	1mM
ITS	0.5%

한편, 본 발명에 따른 핵 이식란의 생체 외 배양은 서로 다른 배지에서 배양되는 1차 배양 및 2차 배양으로 이루어지는 것이 바람직하며, 1차 배양은

G1.2 배지에서, 2차 배양은 SNUnt-2 배지에서 배양하는 것이 바람직하다.

제 5단계 : 투명대 또는 이의 일부분의 제거

5           본 발명에 따른 배아 줄기 세포를 수득하기 위해서는 전술한 과정으로 배양된 배반포의 투명대 또는 이의 일부분을 제거해야 한다.

          배반포를 먼저 효소 처리하여 투명대(zona pellucida) 또는 이의 일부분을 제거한다. 본 발명에서 배반포로부터 투명대 또는 이의 일부분을 제거하는 방법은 통상적으로 이용되는 방법을 모두 사용할 수 있다. 이러한  
10   예에는 프로나아제(pronase), 산성 타이로드 용액(acid Tyrodes solution) 및 레이저 절개(dissection)와 같은 물리적인 방법 등을 포함한다.

          바람직하게는 프로나아제를 이용하는 것이다. 프로나아제는 PBS 및 G2 또는 S2 배지에 용해하여 이용한다. 한 양태로 PBS와 S2 배지를 1:1로 혼합한 배지에 용해하여 이용할 수 있다. 배반포로부터 투명대를 제거하기 위해서 약  
15   0.1% 프로나아제를 투명대가 제거되기에 충분한 시간 동안 적용시킨다. 바람직하게는 약 1-2분, 더욱 바람직하게는 1-1.5분 동안 적용시킨다.

제 6단계 : 영양막 세포의 제거 및 ICMs의 분리

20

          상기에서와 같이, 투명대가 일단 제거되면, 영양막 세포가 노출된다. 이 영양막 세포는 ICMs로부터 완전히 분리되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 영양막 세포를 ICMs로부터 분리하는데 통상적으로 이용되는 방법이 모두 도입될 수 있다.

본 발명에서는 영양막 세포의 표면에 있는 에피토프에 반응하는 항체 또는 항혈청을 처리하여 영양막 세포를 분리하는 면역수술(immuno-surgery)적 방법 또는 물리적 방법 (mechanical method)을 이용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직한 것은 항체 및 보체 처리를 병행하는 것이다. 이러한 경우에, 5 항체 및/또는 항혈청 및 보체 처리는 개별적으로 또는 동시에 실시할 수 있다. 바람직한 항체 및/또는 항혈청 및 보체의 조합(combination)은 항-태반 알칼라인 포스파타제 항체(anti-placental alkaline phosphatase antibody) 및 베이비 래빗 보체 (Baby Rabbit complement) 또는 항-사람 혈청 항체(anti-human serum antibody) 및 기니아 피그 보체(Guinea Pig complement) 등을 10 포함한다.

항체 및 보체는 SNUnt-2, G2.2 또는 S2 배지에 희석하여 이용한다. 항-태반 알칼라인 포스파타제 항체(anti-AP)는 S2 배지로 1:20으로 희석하여 사용하고, 다른 항체 및 보체는 1:1로 희석하여 사용하는 것이 바람직하다.

15 본 발명에서는 투명대가 제거된 배아에 항체를 처리한 다음 보체를 처리하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 배아는 항체로 약 30분 동안 배양한다. 항체에 노출시킨 후, 배아는 SNUnt-2, G1.2 또는 S2 배지로 세정한 다음 보체에 적용시키는 것이 바람직하며, 적용 시간은 약 30분 정도가 적합하다.

20 상기 배아를 SNUnt-2, G2.2 또는 S2 배지로 세정하여 영양막 세포 또는 이의 일부분을 배아로부터 분리해낼 수 있다. 이 때, 영양막 세포의 분리는 물리적인 수단에 의해 달성될 수 있으며, 바람직하게는 이러한 분리는 작은 보어(bore)를 가진 피펫을 통한 배반포의 피페팅(pipetting)에 의해서 실시될 수 있다.

이러한 과정을 통하여 투명대 및 영양막 세포를 제거하고 ICMs를  
수득한다.

제 7단계 : 섬유아 영양 세포층에서의 ICMs 세포의 배양

5

전술한 과정으로 분리된 ICMs 세포들은 섬유아 영양 세포층(fibroblast  
feeder cell)에서 배양한다. 섬유아 영양 세포층이 없는 경우 세포들은  
분화될 수 있다. 몇몇 경우에 백혈병 억제인자(leucaemia inhibitory factor,  
LIF)는 영양 세포층을 대신하여 세포들을 미분화 상태로 유지하는데  
10 이용되기도 하지만, 사람 세포의 경우에, 고농도 LIF도 섬유아 영양 세포층이  
없는 경우에는 세포를 미분화 상태로 유지할 수 없다. 따라서 통상적으로  
배아 줄기 세포와 관련된 배외(extraembryonic) 분화 및 세포 사멸을 유도하지  
않는 조건은 섬유아 영양 세포층 상에서 배양하는 것을 말한다.

마우스 또는 사람의 섬유아세포를 이용하는 것이 바람직하다. 이들은  
15 단독으로 또는 혼합하여 이용할 수 있다. 더욱 바람직한 것은 본 발명의 환자  
또는 환축의 자가 핵 이식된 배아로부터 유래한 배아 줄기 세포로부터 분화된  
세포를 영양 세포층(feeder)으로 이용하는 것이다 (본 발명자는 이를 자가  
영양 세포층(auto feeder)이라 명명하고자 한다). 가장 바람직하게는 자가 핵  
이식 배아 줄기 세포로부터 섬유아세포로 분화된 세포를 영양 세포층으로  
20 이용하는 것이다. 이러한 세포의 이용을 통하여 궁극적으로 수득하고자 하는  
자가 핵 이식된 배아 줄기 세포가 다른 세포 즉, 유래가 다른 섬유아 영양  
세포층을 구성하는 세포들에 의하여 오염되는 것을 방지할 수 있다.

사람 유래의 섬유아세포는 마우스 섬유아세포와 적합하게 혼합하여  
최적의 줄기 세포 성장 및 분화 억제를 달성할 수 있다.



5      섬유아세포 층의 세포 밀도가 그들의 안정성 및 성능에 영향을 미친다. 세포 밀도는  $\text{cm}^2$ 당 약 25,000개의 사람 세포와 70,000개의 마우스 세포가 가장 바람직하다. 마우스 섬유아세포 단독으로 이용될 때에는 75,000 - 100,000 세포/ $\text{cm}^2$  밀도가 적합하다. 이러한 영양 세포층은 ES 세포의 첨가

10      바람직하게는 마우스 또는 사람의 섬유아세포들은 계대수가 적은(low passage number) 세포들이다. 섬유아세포의 질(quality)은 줄기 세포를 지지하는 능력에 영향을 미친다. 배아의 섬유아세포가 특히 바람직한데, 마우스 세포의 경우에 이들은 13.5일 된 태아(foetus)로부터, 사람의 섬유아세포는 배아 또는 태아 조직으로부터 수득할 수 있으며, 통상적인 세포 배양 프로토콜을 이용해서 배양할 수 있다.

15      마우스 배아의 섬유아세포를 취급하는데 있어서, 기본적인 가이드라인은 트립신의 이용을 최소화하고 과밀화(overcrowding)를 억제하는 것을 포함한다. 이렇게 취급되지 않은 배아의 섬유아세포들은 미분화된 ES 세포의 성장을 지지할 수 없다. 새로이 제조된 마우스 배아의 섬유아세포의 각 배치(batch)는 이들이 줄기 세포의 지지 및 유지에 적합한지를 확인하기 위해서 먼저 테스트되어야 한다.

20      새로운 일차(primary) 배아 섬유아세포가 냉동-해동된 섬유아세포와 비교했을 때 줄기 세포 소생(renewal)을 지지하는데 더욱 적합하다. 그러나 몇몇 배치들을 반복적 냉동 및 해동 후에 그들의 지지 잠재력을 보유하게 되기도 한다. 따라서 ES 세포 소생을 지지하는데 효과적인 것으로 입증된 각 새로운 배치들은 냉동 및 해동 후에 다시 테스트하는 것이 바람직하다. 냉동 및 해동 후에 그들의 잠재력을 보유하게 되는 배치를 이용하는 것이 더욱 바람직하다.

일부 마우스 계통(strain)은 다른 계통 보다 줄기 세포의 유지에 더욱 적합한 배아 섬유아세포를 생산할 수 있다. 예를 들면, 동종번식된 129/Sv 또는 CBA 마우스 또는 129/Sv 와 C57/B16 계통의 교잡으로 생산된 마우스에서 유래된 섬유아세포가 줄기 세포 유지에 가장 적합한 것으로 입증되어왔다.

5 한편, 영양 세포들은 이들의 성장은 저지되도록 처리되는 것이 바람직하다. 몇 가지 방법이 이용될 수 있는데 예를 들면, 방사선 조사 또는 미토마이신 C와 같은 화학물질을 처리하는 것이다. 가장 바람직한 것은 영양 세포들을 미토마이신 C로 처리하는 것이다.

10 이러한 섬유아 영양 세포층은 일반적으로 젤라틴으로 처리된 디쉬 상에서 배양하며 바람직하게는 0.1% 젤라틴으로 처리된 것이다.

ICMs는 섬유아 영양 세포층에서 배양될 수 있으며, 섬유아 영양 세포는 ES 배지에서 유지될 수 있다. 적합한 ES 배지는 20% serum replacement, 0.1mM 베타-메르캅토에탄올, 1% 비필수 아미노산(NEAA), 2mM 글루타민 및 페니실린(50  $\mu$ g/ml), 스트렙토마이신(50  $\mu$ g/ml)으로 보충된 DMEM/F12  
15 배지이다. ES 세포 배양의 초기 단계에서 상기 배지는 사람의 재조합 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast Growth Factor; FGF), 바람직하게는 4ng/ml의 양으로 보충될 수도 있다.

ES 배지는 추가적으로 줄기 세포의 성장 또는 생존을 촉진하거나 줄기 세포 분화를 억제할 수 있는 수용성 성장인자를 보충할 수 있다. 이러한  
20 인자들에는 예를 들면 사람의 다능성 줄기 세포 인자 또는 배아 줄기 세포 소생 인자 등을 포함한다.

분리된 ICMs는 적어도 6일 이상 배양될 수 있으며, 이 단계에서 세포의 콜로니가 발생한다. 이 콜로니는 원칙적으로는 미분화된 줄기 세포로 이루어져 있다. 미분화된 세포의 분리(isolation)는 화학적 또는 물리적 수단

또는 둘 모두에 의해서 달성될 수 있다. 마이크로 피펫을 이용하는 것이 바람직하다. 이러한 물리적인 분리는  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  없는 PBS 배지 또는 디스파제(dispase)와 같은 세포의 분리(dissociation)에 도움이 되는 효소 처리와 병행해서 실시할 수도 있다.

- 5            이러한 과정으로 수득한 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포를 “*hntES*”로 명명하였고, 2003년 12월 29일자로 부다페스트 협약하의 국제기탁기관인 한국세포주 연구재단(KCLRF, 대한민국 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의대암연구소내 소재)에 기탁하고 수탁번호 KCLRF-BP-00092를 부여받았다.

10

#### 제 8단계 : 배아 줄기 세포의 계대 배양

- 본 발명은 이렇게 배양된 줄기 세포를 영양 세포층에서 떼어내서 새로운 영양 세포층으로 옮긴 다음 이를 형태학적으로 미분화된 상태로 증식하기에 충분한 시간동안 배양할 수 있다.
- 15

이 때에, 세포들은 5-7일 동안 배양하는 것이 바람직하다. 그 이후에, 미분화된 줄기 세포 콜로니가 관찰되었다. 줄기 세포는 높은 핵/세포질 비율, 현저한 인(nucleoli), 응축된 콜로니 형성 및 뚜렷한 세포 경계에 의하여 형태학적으로 확인될 수 있다.

- 20            미분화된 줄기 세포의 증식 방법은 줄기 세포 콜로니로부터 미분화된 줄기 세포 응집체(clump)를 분리하는 것에서 시작된다. 이러한 분산(dispersion)은 화학적 또는 물리적인 수단 또는 둘 모두에 의해서 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 세포들은  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  없는 PBS 배지로 세정하거나 물리적인 방법 또는 두 방법을 조합하여 콜로니로부터 분리할 수 있다. 더

바람직하게는 물리적 방법으로 조각내어 계대하는 것이다.

첫 번째 방법에서,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  없는 PBS 배지가 세포간의 부착력을 감소시키는데 이용될 수 있다. 상기 배지로 약 15-20분 적용한 이후에 세포들은 점진적으로 단층으로부터 서로 분리되기 시작하여 목적한 크기의  
5 응집체(clump)로 분리될 수 있다. 세포 분리가 부분적일 때에는, 피펫의 예리한 가장자리를 이용하는 물리적인 분리가 응집체의 분리 및 절단에 유용할 수 있다.

선택적인 화학적 방법은 효소의 이용을 포함한다. 효소는 단독으로 또는 물리적인 방법과 함께 사용될 수 있으며, 효소는 디스파제를 이용하는  
10 것이 바람직하다.

또다른 방식은 콜로니의 물리적인 절단 이후에 디스파제를 이용하여 서브콜로니(subcolony)를 분리하는 혼합된 방식이다. 콜로니의 절단은  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 를 함유하는 PBS 배지에서 실시한다. 마이크로 피펫의 예리한 가장자리는 콜로니들을 약 100개 세포를 포함하는 응집체로 절단하는데 이용될  
15 수 있다. 응집체가 분리되자마자, 이들을 넓은 구멍 마이크로-피펫으로 집어서  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  함유 PBS 배지로 세정한 다음 새로운 섬유아 영양 세포층으로 옮긴다.

이러한 배양 과정에서 줄기 세포가 미분화 상태를 유지하고 있는지 여부를 확인할 필요가 있다. 미분화된 배아 줄기 세포는 앞서 기재된 바와  
20 같이 특징적인 형태학적 특성을 가지고 있다. 줄기 세포를 확인할 수 있는 또다른 방법은 세포 마커 또는 다능성 세포의 특징적인 유전자의 발현을 측정함으로써 가능하다.

다능성 세포의 특징적인 유전자 또는 특유의 계통(lineage)의 예에는 이에 제한되는 것은 아니지만, 줄기 세포의 마커로서 AP, Oct-4, SSEA-3,

SSEA-4를 포함한다. 줄기 세포에 특징적인 다른 유전자들은 제네시스(genesis), GDF-3 및 크립토(Cripto)를 포함한다. 그러한 유전자 발현 프로파일은 RT-PCR, 분화 유전자 발현 방법, 마이크로 어레이 분석 또는 관련된 기술을 포함한 어떠한 방법에 의해서 달성될 수 있다

- 5           바람직하게는 줄기 세포는 SSEA-4, GCTM-2 항원, TRA 1-60을 포함한 사람 다능성 줄기 세포 마커와의 면역반응 여부에 의해서 확인될 수 있다. 바람직하게는 이러한 세포들은 전사 인자로 Oct-4를 발현하며 또한 정상 이배체 핵형(normal diploid karyotype)을 유지하고 있다.

- 10           줄기 세포의 진행(progress) 및 이들의 분화 또는 미분화 상태 유지는 배양 배지에 분비되는 줄기 세포 특이적인 물질들의 정량 측정 또는 ELISA 또는 관련된 기술을 이용하여 세포의 고정된 현미표본(preparation)에서 모니터될 수 있다. 이러한 줄기 세포 특이적인 물질들은 CD 항원의 가용성 형태 또는 GCTM-2 항원을 포함하며 또한 이들은 세포 마커 또는 유전자 발현을 이용하여 상기 기재된 바와 같이 모니터할 수 있다.

15

3. 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포로부터 분화된 신경 세포 및 이의 제조방법

- 20           본 발명은 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받은 개체의 체세포에서 유래된 핵을 난자로 이식하여 형성된 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포를 포함한다.

또한, 본 발명은

(1) 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주를 배양하여 배아체(embryonic body)를 형성하는 단계;

(2) 화학물질(chemical)을 첨가하여 배양하는 단계 및

(3) 신경 세포의 마커를 발현하는 세포를 선별하는 단계를 포함하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포의 제조방법을 포함한다.

5

이하에서는 본 발명에 따른 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포로부터 신경 세포로의 제조방법을 단계별로 구체적으로 기술하고자 한다.

#### 제 1 단계 : 배아체(embryonic body)의 생성

10

앞서 수득한 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주(ntES 세포)를 신경 세포로 분화하기 위한 첫 단계는 ntES 세포를 배아체로 생성시키는 것이다. 줄기 세포주로부터 배아체를 형성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

15

본 발명은 한 양태로서 배양된 ntES 세포 콜로니를 비접착성의 배양 디쉬로 옮겨서 3일 내지 5일 동안 배양함으로써 배아체를 생성할 수 있다. 상기 배양시 통상 하루가 경과한 후에 부유하는 배아체(약 40 내지 60개의 배아체/디쉬)가 자라나기 시작한다. 이 때에, 상기 배아체를 새로운 디쉬로 옮기면서 잔류하는 영양 세포들을 제거하는 것이 바람직할 것이다. 그 다음

20 이렇게 생성된 배아체는 (폴리오르니틴/라미닌으로 코팅된) 접착성의 디쉬에 플레이트한다.

#### 제 2 단계 : 화학물질의 첨가로 신경 세포로 분화 유도

본 발명에 있어서, 단계 (1)에서 수득한 배아체들을 신경 세포로 분화할 수 있는 화학물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 예를 들면, ITSF(Insulin, Transferrin, Sodium selenite, Fibronectin) 또는 레티노인산(Retinoic Acid) 또는 N2 배지 등이 있다. 이들을 배지에 첨가하여 계속 배양하여  
 5 확장(expansion) 및 분화함으로써 ntES로부터 분화된 신경 세포를 수득할 수 있다.

본 발명에서는 한 양태로 앞서 생성된 배아체를 하루 더 배양한 후에, ITSF 즉, 인슐린 (약 25 $\mu$ g/ml), 트랜스페린 (약 100 $\mu$ g/ml), 소듐 셀레네이트 (약 30nM) 및 피브로넥틴 (약 5 $\mu$ g/ml)으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 5일  
 10 내지 10일 동안 배양하여 EB의 신경 세포로의 분화를 유도할 수 있다.

### 제 3 단계 : 신경 세포 마커를 발현하는 세포의 선별 및 배양

단계 (2)에서 분화된 세포들 중에서 신경 세포 마커, 예를 들면,  
 15 네스틴(nestin)을 발현하는 세포를 선별한 다음 이들을 배양함으로써 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주로부터 분화된 신경 세포를 수득할 수 있다.

본 발명에서 이 과정의 바람직한 양태는 마커 양성인 세포를 선별하고, N2 배지, 라미닌(laminin), bFGF로 보충된 DMEM/F12 배지에서 5 내지 7일 배양하여 세포의 확장을 개시하고, 그런 다음 이들을 bFGF가 제외된 N2 배지  
 20 및 라미닌으로 보충된 DMEM/F12 배지로 8일 내지 14일 동안 배양하는 것이다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 제한되지 않는다는 것은

당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

#### <실시예 1>

##### 5      수핵 난자 및 공여핵 세포의 준비

난자 기증자들을 신체 및 정신 검사를 통해서 자세하게 스크리닝한 후 여포자극 호르몬(follicle stimulation hormone, FSH)을 연속적으로 주입하여 과배란(superovulation)을 유도하였다. 사람의 융모성생식선자극호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG)을 주입한 후 36시간째에, 난구-난모세포 복합체(cumulus-oocyte complex, COCs)를 회수하여 G1.2배지(Vitro life, Goteborg, Sweden) 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 포화습도 배양기에서 40분 동안 배양하였다. COC는 히알루로니다제(0.1% (w/v), hyaluronidase; Sigma Co., Saint Louis, MO)로 1시간 동안 처리해서 난구세포(cumulus cell)를 15 분산시켰다. 여기에서, 형태 지름(modal diameter)이 직경 : 10-12mm인 난구세포가 공여핵 세포로서 선택되었다.

#### <실시예 2>

##### 20      수핵 난자의 탈핵, 융합 및 활성화

실시예 1에서 수득한 난자를 G1.2 배지에서 배양해서 탈핵하기 앞서 1 내지 2시간 동안 핵의 성숙을 유도하였다. 이어지는 탈핵, 핵 이식 및 전기 융합은 다음과 같이 실시하였다.



## (1) 수핵 난자의 탈핵 및 체세포의 핵 이식

수핵 난자를 세정용 G 1.2 배양액에서 1회 세정하고, 5ml의 세정용 G 1.2 배양액에 하이알루로니다제 0.05g을 용해시킨 용액 111  $\mu$ l과 세정용 G 1.2 5 1ml을 혼합하여 최종 농도를 0.1%로 적정한 하이알루로니다제 용액 내에 난자를 옮긴 다음, 난구 세포를 제거하고 세정용 G 1.2 배양액에서 3회 세정하고 정치시켰다. 이어, 7.5mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 사이토칼라신 B(cytochalasin B)을 용해시킨 용액 1  $\mu$ l와 10% 소 태아 혈청이 첨가된 세정용 G 1.2 배양액 1ml을 혼합한 사이토칼라신 B 용액으로 난자를 옮기로, 10 미세작업장치를 사용하여 정치된 수핵난자의 투명대를 절개하여 절개창을 형성시킨 후, 이를 통하여 전체 세포질의 10 내지 15%에 해당하는 양의 난자의 세포질을 제거함으로써 난자를 탈핵시켰다.

보다 더 구체적으로 탈핵과정을 설명하면, 작업용 디쉬를 미세작업장치의 미세작업판 위에 놓고, 미세작업장치의 왼쪽 암에는 고정용 15 피펫을, 오른쪽 암에는 절개용 피펫을 장착하였다. 그런 다음, 고정용 피펫은 9시 방향에 위치시키고 절개용 피펫은 3시 방향에 위치시켰다. 피펫 조절기를 중립에 놓아 피펫이 상하 좌우로 자유롭게 움직일 수 있도록 조정하였다. 두 피펫을 작업용 미소적에서 상하 유동시키면서, 피펫이 디쉬의 테두리에 닿지 않도록 각도를 조정하고, 피펫 끝을 미소적의 중앙에 위치시켰다. 내경 20 200  $\mu$ m 이상의 세정용 마우스 피펫을 이용하여 세정용 G 1.2배양액에서 난자를 사이토칼라신 B 용액으로 이동시켰다. 이어, 미세작업장치의 조동나사와 미동나사를 이용하여 난자에 먼저 초점을 맞추고, 2개의 피펫을 상하로 움직여 초점을 조정하였다. 2개의 피펫을 움직여서 고정용 피펫의 12시 방향에 제 1 극체가 위치하도록 하고, 고정용 피펫을 난자의 9시 방향에 밀착시킨 뒤,

유압을 걸어 난자를 고정시켰다.

도 3는 고정용 피펫과 절개용 피펫으로 수핵 난자의 투명대를 절개하는 과정을 나타낸다. 도 3에서 보듯이, 절개용 피펫(2)을 1시 방향에서 찔러서 투명대를 통과시킨 후, 세포질에 손상을 가하지 않도록 주의하며 11시  
5 방향으로 관통시켰다. 고정용 피펫(1)에 압력을 걸어 난자(3)을 분리하고, 절개용 피펫이 통과한 제 1 극체 상단부의 투명대에 고정용 피펫을 접촉시킨 다음, 두 피펫을 마찰하여 투명대를 절개하였다.

도 4는 수핵난자의 제 1극체와 핵을 제거하는 탈핵과정을 나타낸다. 도 4에서 보듯이 난자(3)를 회전시켜 절개창을 수직으로  
10 위치시키고, 고정용 피펫(1)을 난자의 밑 부위에 위치시켜 난자가 아래쪽으로 움직이지 못하도록 지지한 다음, 절개용 피펫(2)을 난자의 위체서 가볍게 눌러 난자를 탈핵시켰다. 이처럼 탈핵된 난자를 세정용 G 1.2 배양액으로 3회 세정하고, 배양용 G 1.2 배양액에 정치시켰다.

그런 다음, 미세작업장치를 사용하여 탈핵된 수핵난자에 준비된  
15 공여세포를 이식하였다. 먼저, 5mg의 PHA-P(phytohemagglutinin)를 10ml의 세정용 G 1.2 배양액에 용해시킨 용액 100  $\mu$ l과 400  $\mu$ l의 세정용 G 1.2 배양액을 혼합한 PHA-P 용액으로 작업용 디쉬 상단 중앙에 4  $\mu$ l의 이식용 미소적으로 만들고, 1% 소태아 혈청이 첨가된 PBS로 이식용 미소적 위 아래에 각각 1개씩의 4  $\mu$ l의 공여세포 미소적을 만들었다. 이들 미소적을 미네랄  
20 오일로 도포한 후, 작업용 디쉬를 미세작업판에 위치시켰다.

미세작업장치에 장착된 절개용 피펫을 이식용 피펫으로 교체한 후, 정치된 탈핵된 난자를 세정용 G 1.2 배양액으로 3회 세정하고, 이소용 미소적으로 이동시킨 다음, 이식용 피펫을 사용하여 공여세포를 이식용 미소적으로 이동시켰다.

도 5는 탈핵된 난자에 체세포를 이식하는 과정을 나타낸다. 도 5에서 보듯이, 탈핵된 난자(3)의 절개창을 양 피펫과 1시 방향으로 놓고 고정용 피펫(1)으로 고정한 다음, 이식용 피펫(4)을 절개창으로 주입하고, 유압으로 공여세포를 주입하여 핵 이식란을 작제하였다. 이처럼, 작제된 핵 이식란을

5 세정용 G 1.2배양액으로 옮겨서 3회 세정한 후, 정치시켰다.

## (2) 전기 융합에 의한 핵 이식란의 작제

BTX-세포 조작기(electro cell manipulator)를 사용하여 핵 이식란을

10 전기 융합시켰다.

0.5mM HEPES 완충용액(pH 7.2)에 0.1mM  $MgSO_4$ , 0.05%BSA 및 0.28mM 만니톨을 용해시킨 만니톨 용액 15  $\mu$ l을 세정용 마우스 피펫으로 핵 이식란이 있는 세정용 G 1.2 배양액에 첨가하고, 1분간 정치시켰다. 그런 다음, 세정용 마우스 피펫을 이용하여 핵 이식란을 세정용 G 1.2 배양액이 첨가된 만니톨

15 용액에 주입하여 다시 1분간 정치시키고, 세정용 마우스 피펫을 이용하여 핵 이식란을 만니톨 용액에 넣었다. 이어, 핵 이식란을 BTX-세포 조작기에 연결시킨 2개 전극(3.2mm chamber No. 453) 사이에 분주된 만니톨 용액에 넣고, 공여세포가 (+) 전극을 향하도록 핵 이식란을 위치시켰다. 전압은 1kV/cm, 시간은 15  $\mu$ s, 횟수는 1초 간격으로 2회의 조건에서 직류전류를 통전하여 핵

20 이식란을 전기융합시켰다. 융합된 핵 이식란을 만니톨 용액을 거쳐 세정용 G 1.2 배양액으로 옮긴 후, 3회 세정하였다.

## <실시예 3>

### 핵 이식란의 활성화 및 생체 외 배양

실시에 2에서 수득한 핵 이식란은 정상적인 배 발생을 유도하는데  
 주요인 중의 하나인 정자에 의한 활성화를 받지 못하기 때문에 인공적인  
 자극이 필요하다. 이를 위한 최적의 조건을 설정하기 위해서, 표 2에 기재된  
 5 바와 같이 핵 이식란을 리프로그래밍 시간이 경과한 이후에 여러 방법으로  
 활성화시키고 또한 생체 외 배양하였다.

먼저, 리프로그래밍 시간이 배반포 형성률에 미치는 영향을 확인하고자  
 리프로그래밍 시간을 각각 2, 4, 6, 20으로 변화시키고 활성화 방법 및 생체의  
 배양 조건을 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이 동일하게 설정하였다. 이를  
 10 통하여 리프로그래밍 시간이 약 2시간일 때 최고의 배반포 형성률이 나타남을  
 알 수 있었다.

또한, 활성화 방법이 배반포 형성률에 미치는 영향을 확인하고자  
 고정된(2시간) 리프로그래밍 시간이 경과된 핵 이식란을 25  $\mu$ M G1.2 배지에서  
 37°C, 5분 동안 칼슘 이온운반체 123187(5 또는 10  $\mu$ M; Sigma) 또는  
 15 이오노마이신(5 또는 10  $\mu$ M; Sigma) 중 어느 하나로 활성화시킨 다음 G1.2  
 배지로 수차례 세정하고, 2mM 6-디메틸아미노푸린(6-dimethylaminopurine,  
 DMAP; Sigma)를 포함하는 G1.2 배지에 옮겨서 37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 89% N<sub>2</sub>에서  
 4시간 동안 활성화하였다. 그런 다음 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이 이들을  
 동일한 배양 조건에서 배양하였다. 이를 통하여 10  $\mu$ M 이온운반체를 처리하고  
 20 2.0mM 6-DMAP를 처리하는 활성화 방법이 최고의 배반포 형성률이 나타남을  
 확인할 수 있었다.

아울러, 생체 외 배양 조건이 배반포 형성률에 미치는 영향을  
 확인하고자 상기된 최적의 리프로그래밍 시간 및 활성화 후에 핵 이식란은  
 G1.2 배지로 세차게 세정하고 10  $\mu$ l G1.2 배지 드롭(drop) 또는 SNUnt-2

배지에 37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 89% N<sub>2</sub> 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 3일째에 분리한 배아는 다른 배지로 옮겨서 또 다시 6일 동안 배양하였다. 이를 통하여 G1.2 배지에서 일차 배양하고 SNUnt-2 배지에서 이차 배양함으로써 최고의 배반포 형성률을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

- 5 이러한 다양한 리프로그래밍 시간, 활성화 방법 및 배양 조건에 따른 배반포 형성률은 하기 표 2에 정리하였다.

<표 2> 사람 체세포 핵 이식의 최적화 조건

활성화 조건		재프로 그래밍 시간(h)	1단계 배지	2단계 배지	난모 세포 개수	하기 발달된 클로닝 배아의 개수(%)		
						2-세포	상실배	배반포
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP <sup>a</sup>	2	G1.2	SNUnt-2	16	16(100)	4(25)	4(25)
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	4	G1.2	SNUnt-2	16	15(94)	1(6)	0
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	6	G1.2	SNUnt-2	16	15(94)	1(6)	1(6)
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	20	G1.2	SNUnt-2	16	9(56)	1(6)	0
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	SNUnt-2	16	16(100)	5(31)	3(19)
5 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	SNUnt-2	16	11(69)	0	0
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	SNUnt-2	16	12(75)	0	0
5 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	SNUnt-2	16	9(56)	0	0
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	SNUnt-2	16	16(100)	4(25)	3(19)
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	G2.2	16	16(100)	0	0
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	SNUnt-2		16	16(100)	0	0
10 $\mu$ M 이온 운반체	6-DMAP	2	G1.2	SNUnt-2	66	62(93)	24(36)	19(29)

a 2.0mM 디메틸아미노푸린

b 최적의 핵 이식 조건을 결정한 후에, 핵 이식은 4명의 기증자로부터 유래된 66개 난모세포에 대하여 수행되었다.

결국, 핵 이식란은 2시간의 리프로그래밍 시간을 거친 다음  $10\mu\text{M}$  이온  
5 운반체를 처리하고  $2.0\text{mM}$  6-DMAP를 처리하여 활성화 한 다음 G1.2 배지에서  
일차 배양하고 SNUnt-2 배지에서 이차 배양함으로써 정상적인 배 발생을  
달성할 수 있었다.

#### <실시예 5>

#### 10 투명대의 제거 및 영양막 세포의 제거와 ICM의 분리

상기 실시예로부터 수득한 배반포를  $0.1\%$  프로나제(pronase; Sigma)를  
1분 동안 적용하여 투명대를 제거한 다음,  $100\%$  항-사람 혈청 항체(anti-human  
serum antibody; Sigma)를 처리하고,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$ 에서  $10\mu\text{l}$  기니아 피그  
15 보체(Life Technologies, Rockville, MD)에 추가로 30분 동안 노출시킴으로써  
영양막 세포를 제거하고 ICMs를 분리하였다.

#### <실시예 6>

#### ICMs의 배양

20

이렇게 분리된 ICMs는  $0.1\%$  젤라틴으로 코팅된 조직 배양 디쉬에서  
미토마이신 C로 비활성화된 일차 마우스 (C57BL breed) 배아의 섬유아세포  
층상 ( $7.5 \times 10^5$ ) 에서 배양하였다. 배양 배지는 DMEM(Dulbeccoo 's modified  
Eagle medium) 및  $20\%$  (Knockout Serum Replacement),  $0.1\text{mM}$  베타-

메르캅토에탄올(Sigma), 1% 비필수 아미노산, 페니실린(100 units/ml), 스트렙토마이신(100  $\mu$ g/ml), 섬유아세포 성장 인자(4ng/ml, basic fibroblast growth factor, bFGF; Life Technologies)로 보충된 DMEM F12(Life Technologies)로 이루어져 있다. 초기 ES 세포 배양 동안에, 배지는 사람

5 재조합 백혈병 억제 인자((100 units/ml) leucaemia inhibitory factor, LIF; Chemicon, Temecula, CA)로 보충하였다. ICMs에서 유래된 인간 ntES 세포 콜로니가 분리되었고 상기 배양시, 5일 또는 7일에 한번씩 마이크로 피펫을 이용하여 기계적으로 분해하였다.

이러한 과정으로 수득한 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 출기

10 세포를 “*hntES*”로 명명하였고, 2003년 12월 29일자로 부다페스트 협약하의 국제기탁기관인 한국세포주 연구재단(KCLRF 대한민국 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의대암연구소내 소재)에 기탁하고 수탁번호 KCLRF-BP-00092를 부여받았다.

#### 15 <실험예 1>

##### 핵형 분석에 의한 사람 ntES 세포주의 확인

앞서 수득한 콜로니들은  $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Mg}^{2+}$ 를 함유하는 PBS로 세정한 후, 시트레이트-아세톤-포름알데히드로 4°C에서, 1시간 동안 고정하고  $\text{Ca}^{2+}$  및

20  $\text{Mg}^{2+}$ 를 포함하는 PBS로 한차례 세정하였다. 알카라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 활성도를 검증하기 위해서 AP 키트(Sigma)를 사용하였다. 이때 사용된 단일클론 항체는 다음과 같다: Oct-4(SC-5279; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); SSEA-1(MC480), SSEA-3(MC631) 및 SSEA-4(MC-813-70; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA); TRA-1-60 및

TRA-1-80(Chemicon). 일차 항체는 Vectastatin ABC 시스템(Vector laboratory, Burlingame, CA)를 이용하여 바이오티닐레이티드 이차 항체 아비딘 및 호스라디쉬 퍼옥시다제 접합된 복합체로 위치를 밝혀냈다.

계놈 DNA 및 사람의 STR 마커에 대하여 자동화된 ABI 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster city, CA)상에서 STR AMP FLSTR PROFILER 키트를 이용해서 DNA 지문법(finger printing) 분석을 실시하였다. 5  
이의 분석 결과는 도 6에 나타내었다.

도 6에 따르면, 본 발명에서 수득한 작 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주의 핵형 분석 결과와 상기 배아 줄기 세포주에 핵을 제공한 환자의 체세포 핵형 분석 결과가 동일한 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에서 10  
수득한 배아 줄기 세포주는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 것임을 알 수 있다.

#### <실험예 2>

##### teratoma 분석을 통한 줄기 세포주의 확인

15

미분화 줄기 세포 100개 콜로니를 배양 디쉬에서 분리하여 1 cc 주사기에 넣어 SCID mouse (KRIBB, Korea)의 고환(testis)에 주입한 후 8주간 배양하였다. 형성된 테라토마(teratoma)를 고정하여 면역 조직화학검사를 시행하여 3배엽의 세포가 생성되었는지 확인하였다. 20  
이의 분석 결과를 도 6에 나타내었다.

도 7에 따르면, 실시예 6에서 수득한 배아 간세포주는 고환(testis)에 3배엽을 형성하는 것을 볼 수 있다. 따라서, 본 발명에서 수득한 세포는 다양한 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 다능성 배아 줄기 세포주임을 알 수 있다.



## &lt;실험예 3&gt;

면역 조직 화학염색에 의한 EB 형성 및 확인

- 5           사람 ntES 세포 콜로니를 0.1% 트립신/1mM EDTA로 처리하여 분리한 다음 플라스틱 페트리 디쉬로 옮겼다. 사람 ntES 세포는 hLIF 및 bFGF 없이 DMEM/DMEM F12에서 14일 동안 배양하였다. 파라핀 고정을 위해서, ntES 세포는 PBS에서 제조된 용해된 1% 저용융 아가로스에 옮기고 42℃까지 냉각시켰다. ntES 세포를 포함하는 고체화된 아가로스는 PBS로 용해한 4%
- 10   파라포름알데히드에 고정시키고 파라핀에 심어넣었다. 개개의 6-mm 섹션을 슬라이드에 배치하고 면역조직화학적(immunohistochemical) 분석을 수행하였다. 사용된 항체는 다음과 같다: 알파-1-페토프로테인(18-0003), 사이토케라틴(18-0234), 데스민(18-0016), 뉴로필라멘트(18-0171) 및 S-100(18-0046)은 Zemed(South San Francisco, CA)로부터 구입하였고 HNF-2-
- 15   알파(SC-6556), BMP-4(SC-6896), Myo D(SC-760) 및 NCAM(SC-7326)은 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. 일차 항체는 바이오티닐레이티드 이차 항-래빗, 항-마우스 또는 항-고오트 그런 다음 스트렙타비딘 접합된 겨자무 퍼옥시다제 및 디아미노벤지딘 크로마젠으로 위치를 밝혀냈다. 이의 결과들도 8에 나타내었다.
- 20           도 8에 따르면, 실시예 6에서 수득한 배아 줄기 세포주는 배아체를 형성할 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명에서 수득한 세포는 배아 줄기 세포주임을 알 수 있었다.

## &lt;실시예 9&gt;

신경 세포로의 분화(1) 미분화된 ES 세포의 확장

앞서 확립된 ES 세포주를 2% 젤라틴으로 코팅된 배양 플레이트에  
 5 충전된 세포분열이 불활성화된 마우스 배아의 섬유아세포 영양 세포층에서  
 배양하였다. 상기 배양 시에 knock-out DMEM, 10% knock-out serum  
 replacement, 0.1mM 사람의 비필수 아미노산, 0.1mM 베타-메르캅토에탄올, 1mM  
 L-글루타민 및 항생제(100 U/ml 페니실린 G 및 100µg/ml 스트렙토마이신)로  
 이루어진 배지를 이용하며, 매일 교환해주었다.

10

(2) 배아체(embryonic body)의 생성

배양된 ES 세포 콜로니를 피펫 팁으로 가볍게 긁어서 벽으로부터  
 수집하여 비접착성의 배양 디쉬로 옮겨서 배양하였다. 하루가 경과한 후에, ES  
 세포 콜로니들은 부유하는 배아체(~50/디쉬)로 자라나기 시작하였다. 이 때,  
 15 배아체를 새로운 디쉬로 옮기면서 잔류하는 영양 세포들은 모두 제거하였다.  
 추가로 4일 동안 배양한 후에, 생성된 배아체는 (폴리오르니틴/라미닌으로  
 코팅된)접착성의 디쉬에 플레이트하였다.

(3) 네스틴-양성인 세포의 선별

20 접착성 디쉬에서 1일 동안 배양한 후에, 분화하는 배아체를  
 인슐린(25µg/ml), 트랜스페린(100µg/ml), 소듐 셀레나이트(30nM) 및  
 피브로넥틴(5µg/ml)으로 보충된 DMEM/F12에 옮겨서 6일 동안 배양하였다.  
 이렇게 배양된 세포는 네스틴 항체를 0.01M PBS, 1% BSA, 5mM EDTA 함유  
 용액으로 1/1000로 희석한 용액으로 40분 동안 37℃에서 배양하였다. 새로운

배지로 세정한 다음 세포들은 피코에리스틴(phycoerythrine, PE)-접합된 이차 항체로 추가로 30분 동안 배양하고 새로운 배지로 3차례 세정하였다.

#### (4) 네스틴-양성인 세포의 확장(expansion)

5 선별된 네스틴-양성 세포를 N2 배지, 라미닌(1ng/ml), bFGF(10ng/ml)로 보충된 DMEM/F12 배지에서 6일 동안 배양함으로써, 확장하였다.

#### (5) 신경 세포로의 분화

그런 다음 네스틴-양성인 세포들을 bFGF를 제거하고 라미닌(1ng/ml) 및  
10 N2 배지로 보충된 DMEM/F12 배지로 10일 동안 배양하여 분화를 유도하였다.

본 발명에 따른 자가 핵 이식란으로부터 유래한 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포를 도2에 나타내었다.

#### 15 산업상 이용 가능성

본 발명에 따라 제조된 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주는 이식받을 개체의 개념을 가지고 있기 때문에 면역 거부반응 없이 이식할 수 있을 뿐만 아니라, 특정 세포 또는 조직으로의 분화를 유도하여  
20 당뇨병, 파킨슨 병과 같은 퇴행성 질환을 치료하는데 이용될 수 있다.

## 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 19쪽 10~24 줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학재료에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징                      이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□	
기탁기관  한국세포주 연구재단(KCLRF)	
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기재)  한국세포주 연구재단(KCLRF)  (120-091) 대한민국 서울시 종로구 연건동 28 서울대 의대암연구소내	
기탁날짜                      2003. 12. 29	기탁번호                      KCLRF-BP-00092
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)  <div style="text-align: right;">별도의 다음 페이지에 계속□</div>	
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 사항	
E. 별도의 보충적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임  <div style="text-align: center;">(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)</div>	

수리관청 기재란
<input type="checkbox"/> 국채출원과 함께 수리되었음
담당관

국제사무관 기재란
<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의하여 수리되었음
담당관

PCT/RO/134(July 1988)

특허청구범위

1. 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 개체의 체세포 핵을 탈핵된 난자로 이식하여 형성된 자가 핵 이식란으로부터 유래된

5 배아 줄기 세포주.

2. 제 1항에 있어서, 상기 개체가 포유류인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주.

3. 제 2항에 있어서, 상기 포유류가 사람인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주.

10 4. 제 3항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포주가 KCLRF-BP-00092인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주.

5. (1) 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받을 개체의 체세포를 배양한 세포주를 공여핵 세포로 준비하는 단계;

15 (2) 수핵 난자의 1 극체를 포함한 세포질을 제거하여 난자를 탈핵하는 과정을 포함한 수핵 난자를 준비하는 단계;

(3) 상기 단계 (1)에서 준비된 공여핵 세포를 탈핵된 난자에 이식하고 융합시키는 과정을 포함하는 핵 이식란을 작제하는 단계;

(4) 핵 이식란을 리프로그래밍 시간을 거친 다음 활성화시키고 배반포까지 생체 외 배양하는 과정을 포함하는 배반포를 작제하는 단계 및

20 (5) 상기 배반포에서 ICMs(Inner Cell Mass)를 분리하고 이를 미분화상태가 유지되도록 배양하여 배아 줄기 세포주를 확립하는 단계를 포함하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

6. 제 5항에 있어서, 상기 개체가 포유류인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

7. 제 6항에 있어서, 상기 포유류가 사람인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

8. 제 7항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포주가 KCLRF-BP-00092인 것을  
5 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

9. 제 5항에 있어서, 상기 단계 (4)의 리프로그래밍 시간이 2 시간 내지 3 시간인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

10. 제 5항에 있어서, 상기 단계 (4)의 활성화가 칼슘 이온 운반체를  
10 처리한 다음 6-디메틸아미노퓨린(DMAP)을 처리하는 것임을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

11. 제 10항에 있어서, 상기 칼슘 이온 운반체의 농도가  $5\mu\text{M}$  내지  $10\mu\text{M}$ 인 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

12. 제 10항에 있어서, 상기 6-디메틸아미노퓨린의 농도가 약  $2.0\text{mM}$ 인  
15 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

13. 제 5항에 있어서, 상기 단계 (4)의 생체 외 배양이 서로 다른 배지에서 배양되는 1차 배양 및 2차 배양으로 이루어진 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

14. 제 13항에 있어서, 1차 배양이 G1.2 배지에서 배양하는 것이고 2차  
20 배양이 SNUnt-2 배지에서 배양하는 것임을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

15. 제 5항에 있어서, (1) 2 시간 내지 3 시간의 리프로그래밍 시간을 거치고, (2)  $5\mu\text{M}$  내지  $10\mu\text{M}$ 인 칼슘 이온 운반체를 처리한 다음 약  $2.0\text{mM}$  6-디메틸아미노퓨린(DMAP)을 처리하여 활성화하고, (3) G1.2 배지에서 1차

배양하고 SNUnt-2 배지에서 2차 배양하는 것임을 특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

16. 제 5항에 있어서, 상기 단계 (5)의 배반포에서 ICMs를 분리하는 과정이

- 5           (1) 배반포로부터 투명대 또는 이의 일부분을 제거하는 단계 및  
            (2) 영양막 세포를 제거하고 ICMs를 분리하는 단계를 포함하는 것을  
특징으로 하는 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

17. 제 5항에 있어서, 단계 (5)의 배양이 환자 또는 환축의 자가 핵  
이식된 배아 줄기 세포로부터 분화된 세포에서 배양하는 것임을 특징으로 하는  
10 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

18. 제 17항에 있어서, 상기 분화된 세포가 제 1항 내지 제 4항 중  
어느 한 항에 따른 배아 줄기 세포로부터 분화된 것을 특징으로 하는 자가 핵  
이식된 배아 줄기 세포주의 제조방법.

19. 줄기 세포, 이로부터 분화된 세포 또는 조직을 이식받은 개체의  
15 체세포에서 유래된 핵을 난자로 이식하여 형성된 자가 핵 이식란으로부터  
유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포.

20. 제 19항에 있어서, 상기 개체가 포유류인 것을 특징으로 하는 신경  
세포.

21. 제 20항에 있어서, 상기 포유류가 사람인 것을 특징으로 하는 신경  
20 세포.

22. 제 21항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 KCLRF-BP-00092인 것을  
특징으로 하는 자가 핵이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포.

23. (1) 자가 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주를 배양하여  
배아체(embryonic body)를 형성하는 단계;

(2) 화학물질을 첨가하여 배양하는 단계 및

(3) 신경 세포의 마커를 발현하는 세포를 선별하는 단계를 포함하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포의 제조방법.

5            24. 제 23항에 있어서, 상기 단계 (2)의 화학물질이 ITSF, 레티노인산(Retinoic Acid) 및 N2로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 자가 핵 이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포주에서 분화된 신경 세포의 제조방법.

10           25. 제 23항에 있어서, 상기 개체가 포유류인 것을 특징으로 하는 신경 세포.

26. 제 25항에 있어서, 상기 포유류가 사람인 것을 특징으로 하는 신경 세포.

27. 제 26항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 KCLRF-BP-00092인 것을 특징으로 하는 자가 핵이식란으로부터 유래된 배아 줄기 세포.

15           28. (1) 95 내지 110mM NaCl, (2) 7.0 내지 7.5mM KCl, (3) 20 내지 30mM NaHCO<sub>3</sub>, (4) 1.0 내지 1.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (5) 3 내지 8mM Na-락테이트, (6) 1.5 내지 2.0mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, (7) 0.3 내지 0.8mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, (8) 0.2 내지 0.4mM Na-피루베이트, (9) 1.2 내지 1.7mM 프룩토오스, (10) 6 내지 10mg/ml HSA, (11) 0.7 내지 0.8μg/ml 카나마이신, (12) 1.5 내지 3% 필수아미노산, 20 (13) 0.5 내지 1.5% 비필수아미노산, (14) 0.7 내지 1.2mM L-글루타민 및 (15) 0.3 내지 0.7% ITS으로 구성된 배지.

29. 제 28항에 있어서, (1) 99.1 내지 106mM NaCl, (2) 7.2mM KCl, (3) 25mM NaHCO<sub>3</sub>, (4) 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (5) 5mM Na-락테이트, (6) 1.7mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, (7) 0.5mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, (8) 0.3mM Na-피루베이트, (9) 1.5mM



프룩토오스, (10) 8mg/ml HSA, (11) 0.75 $\mu$ g/ml 카나마이신, (12) 2%  
필수아미노산, (13) 1% 비필수아미노산, (14) 1mM L-글루타민 및 (15) 0.5%  
ITS으로 구성된 배지.

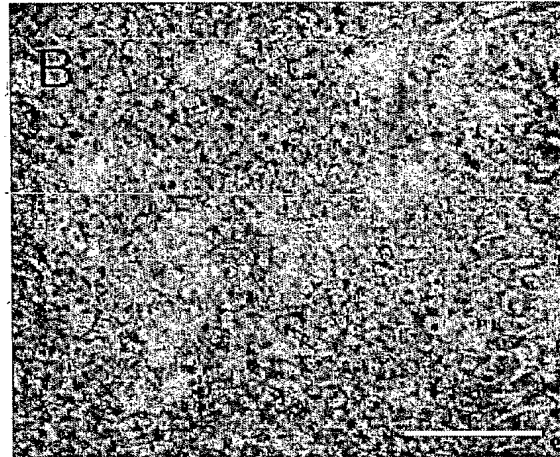
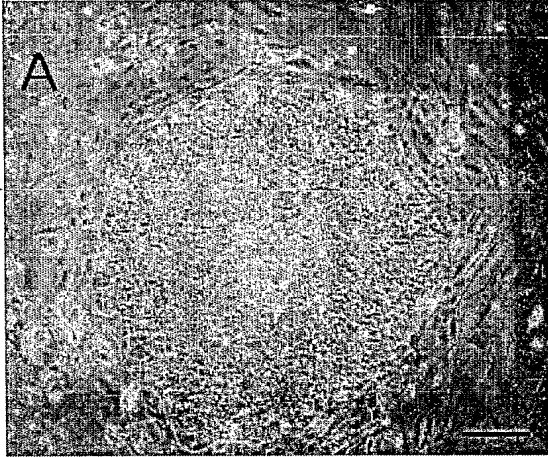
요약서

본 발명은 자가 체세포 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기 세포주 및  
이로부터 분화된 신경 세포에 관한 것으로, 보다 자세하게는 사람 또는 동물의  
5 체세포 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 형성된 핵 이식란을 배반포까지 배양하고,  
상기 배반포로부터 분리한 내세포괴(Inner Cell Mass, ICMs)를 배양하여  
수득한 배아 줄기 세포주 및 이로부터 분화된 신경 세포에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 자가 체세포 핵 이식란으로부터 유래한 배아 줄기  
세포주의 제조방법 및 자가 핵 이식된 배아 줄기 세포로부터 신경 세포로의  
10 제조방법에 관한 것이다.

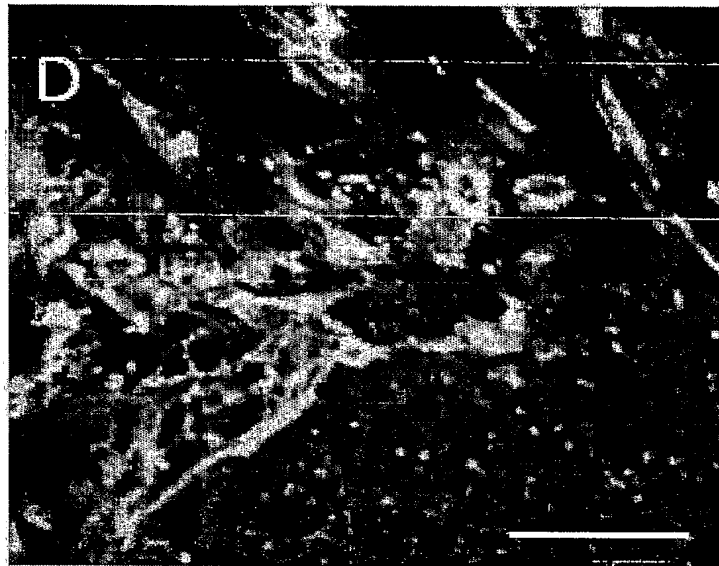
1/11

FIG. 1



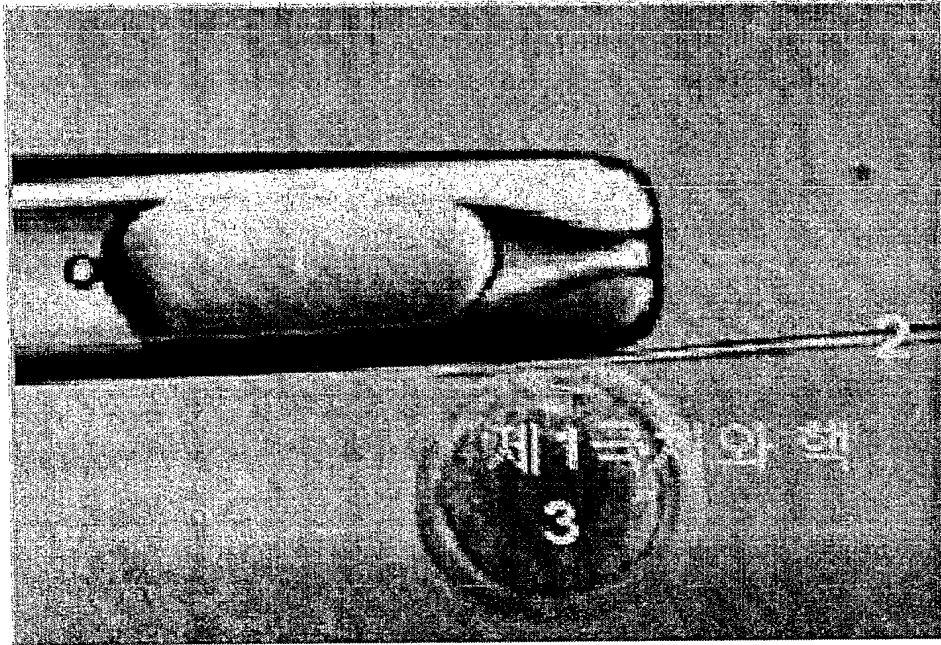
2/11

FIG. 2



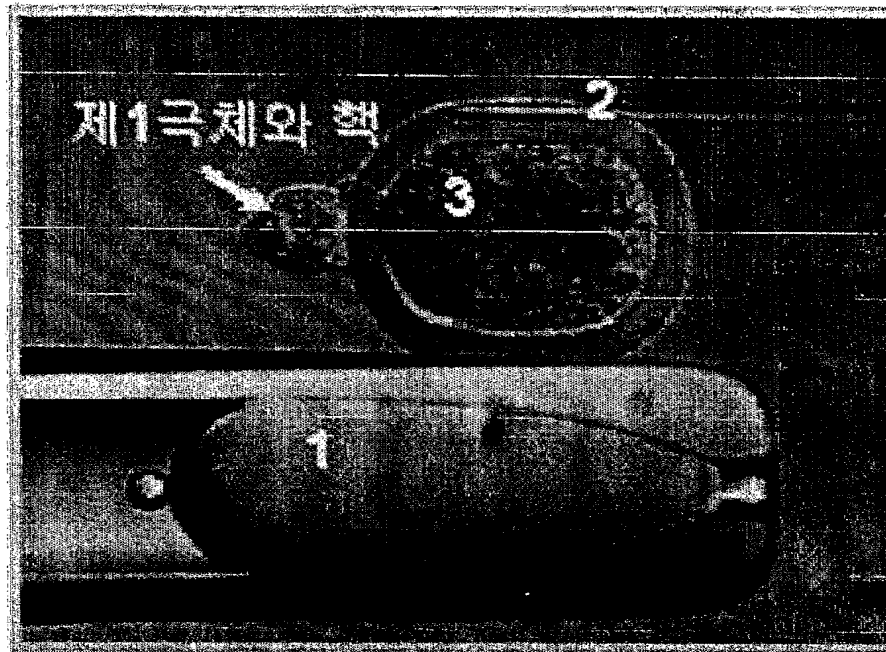
3/11

FIG. 3



4/11

FIG. 4



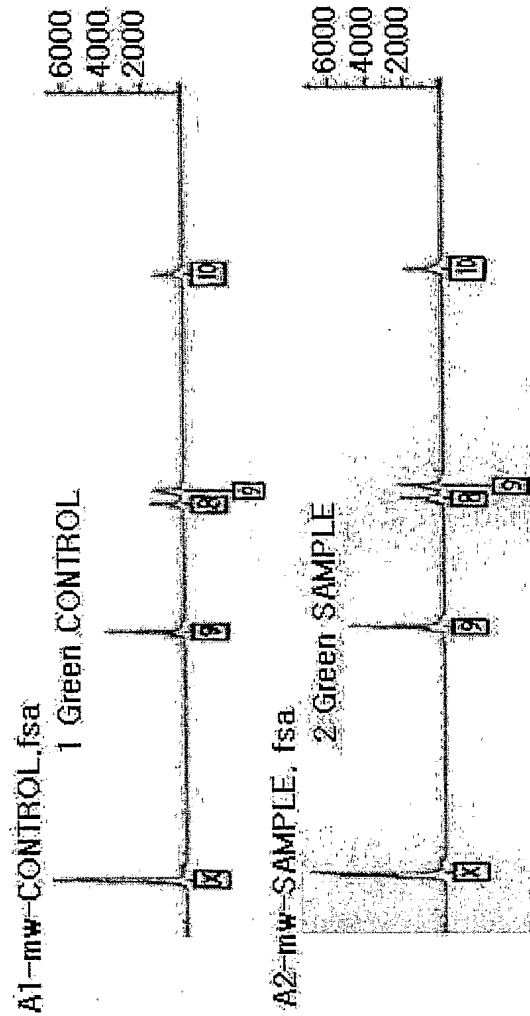
5/11

FIG. 5



6/11

FIG. 6A

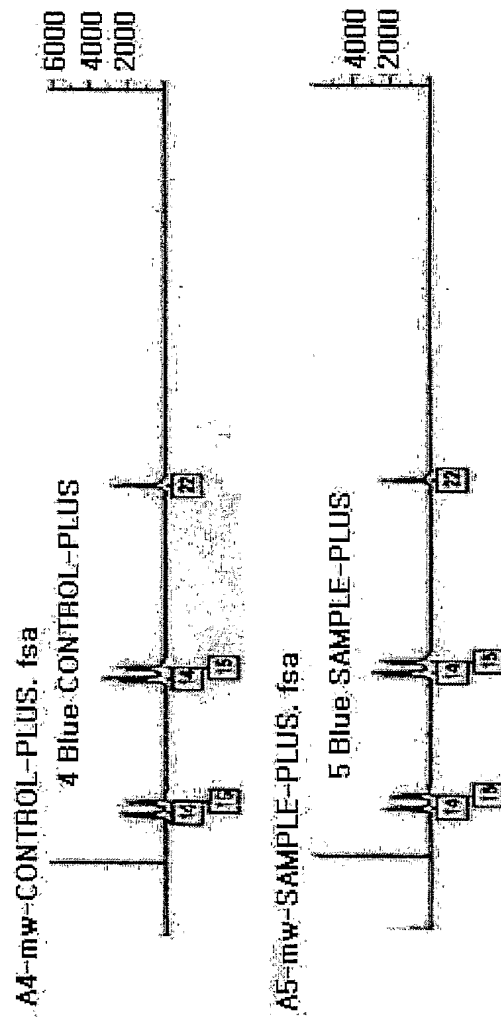


X: Amelogenin (SEX), 8: TPOX, 9: TH01, 10: CSF1PO



7/11

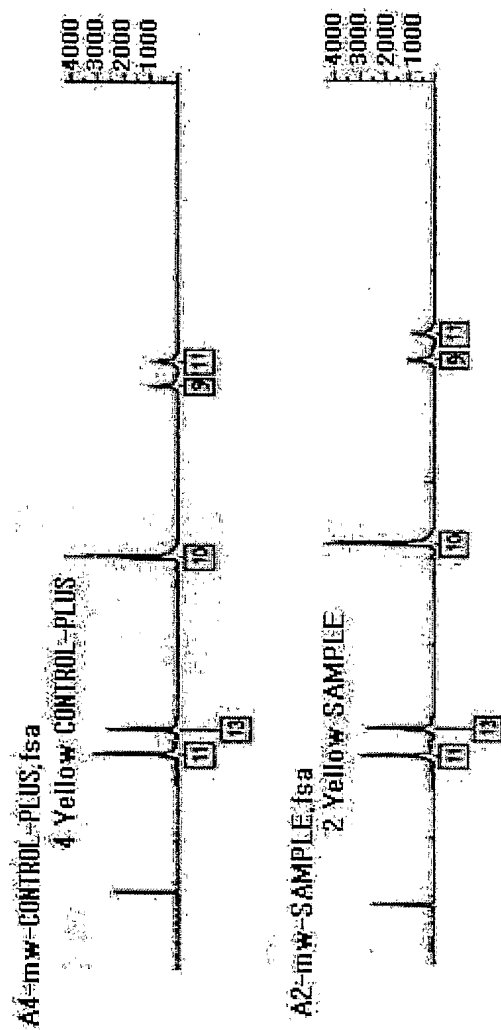
FIG. 6B



14: D3S1358, 15: vWA, 22: FGA

8/11

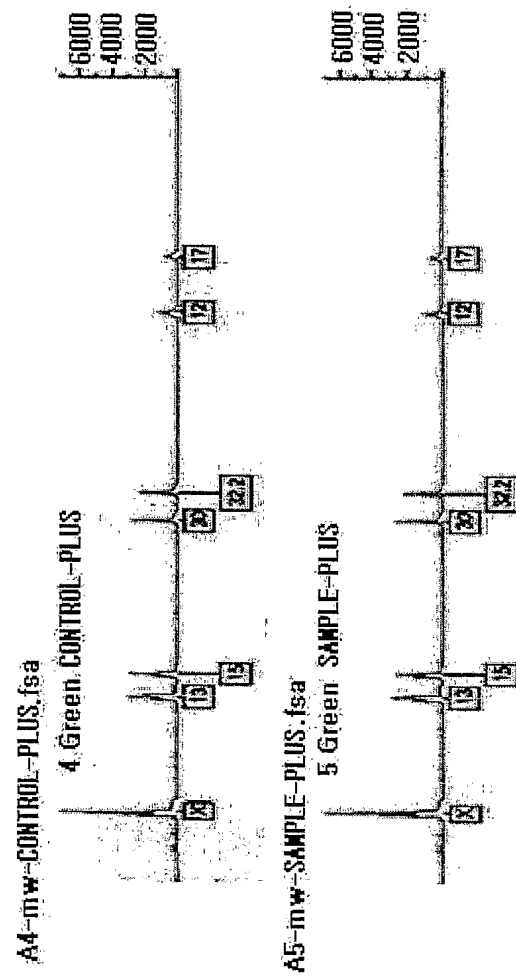
FIG. 6C



11-13: D5S818, 10: D13S327, 9-1: D7S820

9/11

FIG. 6D



13-15: D8S1179, 30-32.2: D21S11, 12-17: D18S51

10/11

FIG. 7



11/11

FIG. 8

